

过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 含量检测试剂盒 (微量法)  
(本试剂盒仅供科研使用)

### 产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0564	过氧化氢 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 含量检测试剂盒 (微量法)	100 管/96 样

### 产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	丙酮 100mL × 1 瓶 (自备)	4℃
试剂二	粉剂 × 1 瓶: 临用前加入 3mL 浓盐酸充分溶解备用。用不完的试剂 4℃ 保存; (溶解时间较长, 约 30min, 可 40℃-60℃ 加热溶解, 务必提前准备)。	4℃
试剂三	液体 10mL × 1 瓶	4℃
试剂四	液体 30mL × 1 瓶	4℃

### 一、产品说明

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是生物体内最常见的活性氧分子, 主要由 SOD 和 XOD 等催化产生, 由 CAT 和 POD 等催化降解。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不仅是重要的活性氧之一, 也是活性氧相互转化的枢纽。一方面, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以直接或间接地氧化细胞内核酸, 蛋白质等生物大分子, 并使细胞膜遭受损害, 从而加速细胞的衰老和解体; 另一方面 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 也是许多氧化应急反应中的关键调节因子。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物, 在 415nm 有特征吸收。

### 二、自备材料

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、丙酮 100mL、浓盐酸 5mL、研钵和冰。

### 三、样品准备

1、组织: 按照组织质量 (g): 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆; 转移至 EP 管中, 用试剂一定容至 1mL, 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、细胞/细菌: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10<sup>4</sup> 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 用试剂一定容至 1mL; 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3、血浆/血清: 直接检测。

### 四、操作步骤

**正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。**

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 415nm, 蒸馏水调零。

2、将试剂二、三和四 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。

3、在 EP 管中按照下表操作:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	250	
试剂一		250
试剂二	25	25
试剂三	50	50
充分混匀, 4000g, 25℃ 离心 5min, 弃上清, 沉淀中加入:		
试剂四	250	250
加入试剂四溶解沉淀后, 室温静置 5min, 取 200μL 转移至微量石英比色皿或 96 孔板中测定 415nm 处吸光值 A。对照管只要做一次即可。计算 $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ 。		

## 五、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的计算

### A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

标准条件下测定的回归曲线,  $y = 0.3744x + 0.0006$  (x 为标准品浓度, μmol/mL; y 为  $\Delta A$ )。

#### 1、按照组织蛋白浓度计算

$H_2O_2$  含量(μmol/mg prot)=[ $(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1$ ]÷( $V1 \times Cpr$ )=2.67×( $\Delta A - 0.0006$ )÷Cpr。

需要另外测定蛋白浓度, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

#### 2、按照样本鲜重计算

$H_2O_2$  含量(μmol/g 鲜重)=[ $(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1$ ]÷( $W \times V1 \div V2$ )= 2.67×( $\Delta A - 0.0006$ )÷W。

#### 3、按照细菌/细胞密度计算

$H_2O_2$  含量(μmol/10<sup>4</sup>)=[ $(\Delta A - 0.0006) \div 0.3744 \times V1$ ]÷( $500 \times V1 \div V2$ )= 0.0054×( $\Delta A - 0.0006$ )。

#### 4、按照血清/血浆体积计算

$H_2O_2$  含量 (μmol/mL) = ( $\Delta A - 0.0006$ )÷0.3744=2.67×( $\Delta A - 0.0006$ )。

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; V2: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

### B. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

标准条件下测定的回归曲线,  $y = 0.7488x + 0.0006$  (x 为标准品浓度, μmol/mL; y 为  $\Delta A$ )。

#### 1、按照组织蛋白浓度计算

$H_2O_2$  含量(μmol/mg prot)=[ $(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1$ ]÷( $V1 \times Cpr$ )= 1.34×( $\Delta A - 0.0006$ )÷Cpr。

需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

#### 2、按照样本鲜重计算

$H_2O_2$  含量(μmol/g 鲜重)=[ $(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1$ ]÷( $W \times V1 \div V2$ )= 1.34×( $\Delta A - 0.0006$ )÷W。

#### 3、按照细菌/细胞密度计算

$H_2O_2$  含量(μmol/10<sup>4</sup>)=[ $(\Delta A - 0.0006) \div 0.7488 \times V1$ ]÷( $500 \times V1 \div V2$ )=0.0027×( $\Delta A - 0.0006$ )。

#### 4、按照血清/血浆体积计算

$H_2O_2$  含量 (μmol/mL) = ( $\Delta A - 0.0006$ )÷0.7488=1.34×( $\Delta A - 0.0006$ )。

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; V2: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

## 六、注意事项

1、 标曲线性范围为 0.1μmol/mL-2μmol/mL, 吸光度  $\Delta A$  线性范围为 0.03-1, 若  $\Delta A$  超过 1 则需要稀释, 计算公式乘以相应稀释倍数。

2、 由于试剂一易挥发, 试剂一必须先预冷再加, 研磨时必须在冰上研磨。

3、 本试剂盒中试剂的挥发性较高, 请带一次性手套和口罩。